



archiwum medycyny sądowej i kryminologii

Praca oryginalna
Original paper

Problemy kliniczne i analityczne zatruc azydkiem sodu ilustrowane przypadkiem samobójczego zatrucia śmiertelnego

Clinical and analytical problems of sodium azide poisonings as exemplified by a case of fatal suicidal poisoning

Sebastian Rojek¹, Piotr Hydzik², Ewa Gomółka³, Karol Kula¹, Małgorzata Kłys¹

¹Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, Polska

²Klinika Toksykologii i Chorób Środowiskowych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, Polska

³Pracownia Informacji Toksykologicznej i Analiz Laboratoryjnych, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, Polska

¹Chair and Department of Forensic Medicine, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

²Department of Toxicology and Environmental Diseases, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

³Poison Information Centre and Laboratory of Analytical Toxicology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

Streszczenie

Cel pracy: Przedstawienie klinicznych i analitycznych aspektów związanych z zatruciami azydkiem sodu. Problemy te zostały zweryfikowane na podstawie przypadku zatrucia azydkiem sodu, unikalnego ze względu na okoliczności zdarzenia oraz opracowanie metodyczne dla celów eksperckich wymiaru sprawiedliwości.

Materiał i metody: Przedmiotem badań była analiza toksykologiczna materiału biologicznego pobranego od kobiety, która w celach samobójczych zażyła w dwóch dawkach azydek sodu zakupiony przez Internet. Po pierwszej dawce postępowanie kliniczne w postaci leczenia objawowego wskazywało na możliwość wyzdrowienia, jednakże zażycie drugiej dawki ksenobiotyku – już w szpitalu – spowodowało zgon. W pracy zastosowano opracowaną do tego celu metodę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-EI-MS-MS) po ekstrakcji połączonej z derywatyzacją przy użyciu bromku pentafluorobenzylowego (PFBBR).

Wyniki: Pośmiertne badania toksykologiczne wykazały obecność azydku sodu we krwi (0,18 mg/l) i moczu (6,50 mg/l) kobiety.

Wnioski: Przypadki zatruc azydkiem sodu są rzadkie, trudne w leczeniu, ale jak wynika z analizy piśmiennictwa w dłuższym interwale czasowym, stale się zdarzają. Dlatego też kazuistyka zatruc azydkiem sodu wraz z opisem metodyki badawczej może się stać przydatna zarówno w aspekcie klinicznym, jak i w toksykologicznym opiniowaniu sądowo-lekarskim.

Słowa kluczowe: zatrucie, azydek sodu, derywatyzacja PFBBR, GC-EI-MS-MS.

Abstract

Aim of the study: To present clinical and analytical aspects associated with sodium azide poisoning. The problems were verified on the basis of a case of sodium azide poisoning which was unique due to its circumstances and the development of an analytical method applied for medico-legal practice.

Material and methods: The object of the study was a toxicological analysis of biological specimens collected from a woman who ingested two doses of sodium azide purchased over the Internet, in a suicide attempt. After the ingestion of the first dose, the clinical management in the form of symptomatic treatment indicated a possibility of recovery. However, the ingestion of a second dose of the xenobiotic, already in the hospital, caused death. Toxicological findings

were obtained with the dedicated technique of gas chromatography-mass spectrometry (GC-EI-MS-MS) after extraction combined with derivatization using pentafluorobenzyl bromide (PFBBBr).

Results: Post-mortem toxicological studies demonstrated sodium azide in the blood (0.18 mg/l) and urine (6.50 mg/l) samples collected from the woman.

Conclusions: Cases of sodium azide poisoning are rare and difficult to treat, but a review of the literature over a longer interval of time shows that they continue to occur. Therefore, case studies of sodium azide poisoning, together with descriptions of research methodology, can be useful both in clinical terms and in the preparation of toxicological expert opinions for medico-legal purposes.

Key words: sodium azide, poisoning, PFBBBr derivatization, GC-EI-MS-MS.

Wprowadzenie

Zatrucia azydkiem sodu podobnie jak zatrucia cyjankami stanowią obecnie rzadkość. W ostatnich dekadach ubiegłego wieku zatrucia azydkiem sodu zdarzały się znacznie częściej, pomimo ograniczonego dostępu do tego typu chemikaliów, jakkolwiek w literaturze przedmiotu odnotowano również przypadki zatruc opisane po 2000 r. [1–6]. Obecnie lista substancji chemicznych mogących mieć zastosowanie do celów samobójczych jest długa, a łatwy dostęp do informacji i możliwość zakupu przez Internet upraszczają procedurę popytu i podaży.

Azydek sodu ze względu na dużą toksyczność, brak odtrutki i niską skuteczność leczenia stanowi poważne zagrożenie życia, zwłaszcza po zażyciu dużych dawek. Klinicyści podkreślają [1], że podstawowe znaczenie dla procesu diagnostycznego ma wnikliwy wywiad oraz kliniczna obserwacja objawów charakterystycznych dla osoby zatrutej. Pomocny w diagnostyce różnicowej może być charakterystyczny mdły zapach popłuczyn żołądkowych, spowodowany obecnością kwasu azotowodorowego, uwalnianego w reakcji azydku z kwasem solnym. Zatrucie ma z reguły przebieg dynamiczny i dramatyczny. Brak możliwości szybkiej diagnostyki do celów klinicznych oraz niewielka liczba diagnozowanych przypadków w klinice ostrych zatruc powoduje, że nie wypracowano dotychczas jednolitej i skutecznej procedury postępowania leczniczego. Ponadto liczne kontrowersje budzą doniesienia dotyczące stosowania oraz skuteczności odtrutek używanych w leczeniu zatruc azydkiem, takich jak w zatruciach cyjankami.

Introduction

Similarly to cyanide poisonings, sodium azide poisonings are a rare phenomenon nowadays. Despite limited access to chemicals of this type, sodium azide poisonings occurred much more frequently during the last decades of the 20th century, however the literature on the subject also includes poisoning cases recorded after 2000 [1–6]. At present, the list of chemical substances which might be used for suicidal purposes is long, and easy access to information coupled with the possibility of making a purchase over the Internet streamline the supply and demand procedure.

As sodium azide is highly toxic, there is no available antidote and treatment is poorly effective, sodium azide poisoning poses a serious risk of death, especially when high doses are ingested. Clinicians emphasize [1] the crucial importance of thorough history-taking and clinical observation of symptoms typically developing in victims of poisoning for the diagnostic process. A potentially useful factor in differential diagnostics is the characteristic dull odour of gastric lavage contents caused by the presence of hydrazoic acid which is released in the chemical reaction of azide with hydrochloric acid. Sodium azide poisoning usually has a dynamic and dramatic course. However, no uniform and effective procedure of medical management has been developed so far, mainly due to the fact that there are no quick diagnostic methods which could be used in the clinical setting, and the number of poisoning cases diagnosed in acute poisoning departments is small. Furthermore, there are considerable controversies related to the application

Literatura przedmiotu podaje wiele przykładów zatruc azydkiem sodu bez skutku śmiertelnego, a także zakończonych zgonem. Przypadki te dotyczyły typowych zatruc przypadkowych osób zatrudnionych przy produkcji odczynników chemicznych i materiałów wybuchowych [7–9] lub też przypadkowego [10, 11] bądź intencjonalnego [1, 2, 5, 12–19] spożycia ze skutkiem śmiertelnym. Odnotowano także przypadki kryminalne, w których podano ofiarom kawę lub herbatę z domieszką azydku [20, 21].

Analiza azydku sodu w materiale biologicznym stanowi niemałe wyzwanie dla chemików analityków. We wcześniejszych pracach stosowano głównie mało specyficzne metody spektrofotometryczne dające wyniki zawyżone, przede wszystkim z uwagi na obecność cyjanku powstającego w procesie biotransformacji azydku [8, 19]. Do analizy azydku sodu stosowano także chromatografię cieczową [13, 14, 22] lub jonową [23]. Współcześnie metodą z wyboru jest chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas oraz procesem izolacji z matrycy biologicznej i derywatyzacją [2, 24].

W nurt omawianego zagadnienia wpisuje się niezwykle przypadek zatrucia ze skutkiem śmiertelnym 50-letniej kobiety. Wyjątkowość przypadku wynika z okoliczności dwuetapowego zatrucia, złożonego obrazu klinicznego oraz ekspertyzy toksykologicznej materiału pośmiertnego z zastosowaniem nowoczesnej metody analitycznej GC-EI-MS-MS po derywatyzacji z bromkiem pentafluorobenzylowym (PFBBBr).

Opis przypadku

Pięćdziesięcioletnia kobieta interesowała się inwestycjami. Transakcje te obarczone są ryzykiem i mogą prowadzić do utraty przez inwestorów znacznych środków finansowych. Kobieta jednak osiągała sukcesy na tym polu i zarabiała duże pieniądze. Kiedy sytuacja uległa zmianie, pokrzywdzona nadal inwestowała, zwiększając tym samym ryzyko i depozyt zabezpieczający. Doprowadziła do znacznych strat finansowych, które próbowała odrobić, wyzbywając się swojego majątku i zaciągając dodatkowe zobowiązania finansowe. Ostatecznie, w związku ze znacznym zadłużeniem, będąca w złym stanie psychicznym pokrzywdzona postanowiła dokonać zamachu samobójczego.

and efficacy of cyanide poisoning antidotes used in the treatment of azide poisonings.

The literature contains many cases of sodium azide poisoning which did not have a fatal outcome, but also cases which ended in death. Available reports describe typical cases of accidental poisoning in workers employed in the production of chemical reagents and explosives [7–9] – or cases of accidental [10, 11] or intentional [1, 2, 5, 12–19] fatal ingestion. Also on record are criminal cases with victims being given coffee or tea spiked with azide [20, 21].

An analysis of sodium azide in the biological material is a major challenge to chemical analysts. Earlier studies relied primarily on relatively non-specific spectrophotometric methods which tended to overestimate the results mainly due to the presence of cyanide arising in the process of azide biotransformation [8, 19]. Sodium azide also used to be analyzed by liquid chromatography [13, 14, 22] or ion chromatography [23]. At present, the method of choice is gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) coupled with the process of extraction from biological material and derivatization [2, 24].

A contribution to the discussion presented above is the unusual case of fatal poisoning in a 50-year-old woman, which is reported below. The unusual nature of this case lies in three factors: the poisoning involved two stages, the victim presented with a complex clinical picture and the toxicological analysis of post-mortem samples was performed using an advanced technique of GC-EI-MS-MS following pentafluorobenzyl bromide (PFBBBr) derivatization.

Case report

A 50-year-old woman started to make investments. Transactions of this type are risky and may cause investors to lose considerable amounts of money. Nevertheless, the woman was successful in her business and made considerable profits. When the situation changed, the woman kept investing, thus increasing the risk and jeopardizing the security deposit. Consequently, she suffered major financial losses, which she tried to recover by selling her property and taking out additional financial commitments. Ultimately, due to her high debt, being in a poor mental state, the woman decided to commit suicide.

Jak wynikało z wywiadu, kobieta miała spożyć w celu samobójczym szczyptę białego proszku zakupionego w Internecie jako azydek sodu. Po spożyciu substancji 4-krotnie traciła świadomość, miała niepamięć zdarzeń oraz samoistnie oddawała mocz. Rodzina pacjentki wezwała pogotowie ratunkowe. Pacjentka nie zgodziła się na przewiezienie do szpitala. Jednakże po upływie kilkunastu godzin kobieta przyznała się do próby samobójczej i została przewieziona do kliniki toksykologii. Pacjentka potwierdziła spożycie azydku sodu. Rodzina dostarczyła opakowanie oznakowane jako azydek sodu.

Na początku leczenia u pacjentki odnotowano: ból głowy, ból mięśni, męczliwość, brak objawów wskazujących na zatrucie, nastrój wyrównany, brak demonstrowanych myśli samobójczych, stan ogólny dobry, samodzielne chodzenie, ciśnienie tętnicze 125/80 mm Hg, tętno 80/min, częstość oddechów 16/min, temperatura ciała 36,6°C. Parametry kliniczne, takie jak mleczały, elektrolity, kreatynina, aminotransferaza alaninowa (ALT), aminotransferaza asparaginianowa (AST), kinaza kreatynowa (CK), nie wzbudzały niepokoju i prezentowały się na poziomie bliskim normie.

W drugiej dobie pobytu w szpitalu nagle doszło do pogorszenia stanu klinicznego i wystąpiły: nudności, pogorszenie stanu świadomości aż do głębokiej śpiączki, niewydolność oddechowa wymagająca intubacji i sztucznej wentylacji, narastające objawy wstrząsu, bradykardia nieodpowiadająca na aminy katecholowe. Po 12,5 godzinie od wystąpienia niepokojących objawów doszło do zatrzymania czynności mięśnia sercowego w mechanizmie asystolii. Zabiegi resuscytacyjne nie przyniosły efektu.

Powodem załamania się zdrowia było ponowne zażycie azydku, który pacjentka ukryła w swoich kosmetykach na wypadek, gdyby została odratowana. Na rycinie 1. przedstawiono azydek sodu w opakowaniu zakupionym oraz odsypanym do oznakowanego jedynie na nakrętce naczynka z napisem „BEIGE NATUREL 51”.

Badanie pośmiertne przeprowadzono w pierwszej dobie po zgonie w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. W wyniku badań stwierdzono makroskopowo: podbiegnięcie krwawe prawego ramienia, niewielkiego stopnia obrzęk płuc, wybroczyny krwawe w błonie śluzowej żołądka, niewielką

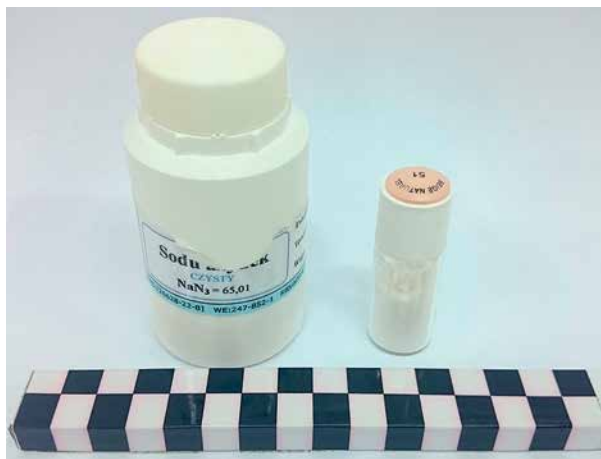
As demonstrated by history, the woman allegedly ingested a pinch of white powder which she had bought over the Internet as sodium azide, for suicidal purposes. After consuming the substance, the victim lost consciousness four times, had no memory of past events and passed urine spontaneously. The patient's family called the ambulance, however the patient refused to be transported to hospital. After the elapse of about a dozen hours the woman confessed to a suicide attempt and was transferred to a department of toxicology. The patient confirmed that she had ingested sodium azide, and her family supplied to the hospital a package labelled as sodium azide.

At the onset of treatment, the patient displayed the following symptoms: headache, muscle pain, fatigue, lack of symptoms indicative of poisoning, even mood, absence of demonstrated suicidal thoughts, good general condition, ability to walk unaided, arterial blood pressure 125/80 mmHg, pulse 80/min, respiratory rate 16/min, body temperature 36.6°C. The patient's clinical parameters, including lactate levels, electrolytes, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), creatine kinase (CK), gave no reason for concern and were close to the norm.

On the second day of hospitalization, the patient's clinical condition suddenly deteriorated. The following symptoms were noted: nausea, increasing impairment of consciousness up to deep coma, respiratory failure requiring intubation and mechanical ventilation, escalating symptoms of shock, bradycardia not responding to catecholamines. After 12.5 hours from the development of alarming symptoms, asystolic cardiac arrest occurred. Resuscitation efforts were not successful.

The reason for the deterioration of the patient's status was the ingestion of another dose of azide which had been hidden by the patient among her cosmetics in case she survived the first dose. Figure 1 shows sodium azide in the packaging in which it was purchased and after being transferred into a small container with a “BEIGE NATUREL 51” label present only on the screw cap.

The post-mortem was conducted during the first day after death at the Department of Forensic Medicine, Jagiellonian University Medical College in Krakow. The following macroscopic findings were noted: ecchymosis on the right arm, mild pulmonary



Ryc. 1. Opakowania zawierające azyd sodu znalezione w domu kobiety (po lewej) i w szpitalu (po prawej)
Fig. 1. Packaging containing sodium azide found in the woman's house (left) and in the hospital (right)

ilość płynu w jamie otrzewnej. W badaniach histopatologicznych mikroskopowych wycinków mięśnia sercowego, mózgu, wątroby, nerki stwierdzono przekrwienie. W czasie sekcji zwłok pobrano materiał do badań toksykologicznych (krew, mocz).

Materiał i metody

Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiły próbki krwi i moczu zabezpieczone od 50-letniej kobiety podczas sekcji zwłok przeprowadzonej w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

Wzorce i odczynniki chemiczne

Azyd sodu (99%), bromek pentafluorobenzylowy (99%), aceton, n-heksan czystości gradientowej do chromatografii gazowej, tetraboran sodu, chlorek miedzi (II), tiosiarczan (VI) sodu, chlorek sodu, kwas chlorowodorowy, tetrafenyloetylen, wodorotlenek sodu czystości do analizy zakupiono w Sigma-Aldrich (Germany).

Metoda analizy proszku

Proszek w postaci białej substancji dostarczony przez rodzinę oraz znaleziony w kosmetykach zmarłej kobiety poddano badaniom identyfikacyjnym, stosując reakcję barwną z chlorkiem miedzi

oedema, petechial haemorrhages in the gastric mucosa and a small fluid-build up in the peritoneal cavity. Histopathological examinations of microscopic cardiac muscle, brain, liver and kidney specimens revealed congestion. During the post-mortem, blood and urine samples were also collected for toxicological analysis.

Material and methods

Biological material

The biological material consisted of blood and urine samples collected from the body of a 50-year-old woman during the post-mortem examination performed at the Department of Forensic Medicine, Jagiellonian University Medical College in Krakow.

Chemical standards and reagents

Sodium azide (99%), pentafluorobenzyl bromide (99%), acetone, n-hexane – gradient grade for gas chromatography, sodium tetraborate, copper (II) chloride, sodium thiosulphate (VI), sodium chloride, hydrochloric acid, tetraphenylethylene, sodium hydroxide – analytical grade were purchased from Sigma-Aldrich (Germany).

Method of powder analysis

The white powdery substance supplied by the family and found among the deceased woman's cosmetics was subjected to identification tests based on

(II) i 0,5 M wodorotlenkiem sodu, uzyskując wynik pozytywny w kierunku obecności azydku sodu [25].

Ekstrakcja

Próbki krwi i moczu poddano ekstrakcji w układzie ciecz–ciecz oraz procesowi derywatywacji prowadzącemu do powstania azydku pentafluorobenzylowego (PFBN₃). W tym celu do 0,2 ml krwi oraz 2 ml moczu dodawano po 0,5 ml nasyconego tetraboranu sodu oraz do krwi 50 mM i do moczu 200 mM bromku pentafluorobenzylowego w acetonie. Próbki przetrzymywano przez 20 min w 50°C. Następnie dodawano 1 ml 0,5 M tiosiarczanu (VI) sodu (mieszadło magnetyczne, 2 min, 50°C), 1 g chlorku sodu, 2 ml wody, tetrafenyloetylen (w ilości 0,100 mg/l dla krwi oraz 0,500 mg/l dla moczu) i 3 ml n-heksanu. Próbki wytrząsano przez 10 minut na wytrząsarce kołowej, odwirowywano i pobierano fazę organiczną, do której dodawano 2 ml 0,5 M HCl. Próbki ponownie wytrząsano przez 10 minut, a następnie odwirowywano, pobierano fazę organiczną i odparowywano do objętości ok. 100 µl.

Metoda GC-EI-MS-MS

Otrzymane eluaty poddano analizie przy użyciu metody chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas w opcji jonizacji elektronowej (GC-EI-MS-MS). Zastosowano chromatograf gazowy model 7890A sprzężony z tandemowym, kwadrupolowym spektrometrem mas z jonizacją elektronową (EI) model 7000A (Agilent, USA).

Detekcję przeprowadzono, wykorzystując tandemowy, kwadrupolowy spektrometr mas pracujący w opcji monitorowania wybranych reakcji rozpadu (MRM). Zastosowane parametry chromatografu gazowego i spektrometru mas zestawiono w tabeli I. W tabeli II zamieszczono parametry fragmentacji badanych związków uzyskane przy użyciu metody GC-EI-MS-MS.

Krzywe kalibracyjne zostały przygotowane poprzez analizę próbek krwi (mocz) wzbogaconych odpowiednio w 0,032, 0,065, 0,162, 0,325, 0,650 mg/l (0,065, 0,130, 0,260, 0,520, 1,040 mg/l) azydku sodu. Każda próbka kalibracyjna wzbogacana była również w tetrafenyloetylen (wzorzec wewnętrzny) w ilości 0,100 mg/l dla krwi oraz 0,500 mg/l dla moczu. Otrzymane krzywe kalibracyjne (ryc. 2.)

the colour reaction with copper (II) chloride and 0.5 M sodium hydroxide, obtaining a positive result for the presence of sodium azide [25].

Extraction

Blood and urine samples were subjected to liquid-liquid extraction and to the process of derivatization producing pentafluorobenzyl azide (PFBN₃). To this aim, to a 0.2 ml sample of blood and a 2 ml sample of urine was added a 0.5 ml portion of saturated sodium tetraborate, followed by the addition of pentafluorobenzyl bromide in acetone in the amounts of 50 mM to blood, and 200 mM to urine. The samples were stored at 50°C for 20 min. Next, the following were added: 1 ml of 0.5 M sodium thiosulphate (VI) (magnetic stirrer, 2 min, 50°C), 1 g of sodium chloride, 2 ml of water, tetraphenylethylene (0.100 mg/l for blood and 0.500 mg/l for urine) and 3 ml of n-hexane. The samples were agitated for 10 minutes on a rotary shaker and centrifuged. Subsequently, the organic phase was collected and combined with 2 ml of 0.5 M HCl. The samples were again agitated for 10 minutes and centrifuged. The organic phase was collected and evaporated to a volume of ca. 100 µl.

GC-EI-MS-MS method

The eluates obtained by the procedure above were analyzed by gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry in the option of electron ionization (GC-EI-MS-MS). The test was performed using a 7890A gas chromatograph coupled with a 7000A tandem quadrupole mass spectrometer with electron ionization (EI) (Agilent, USA).

The detection was performed by means of a tandem quadrupole mass spectrometer in the option of monitoring selected decomposition reactions (MRM). The gas chromatograph and mass spectrometer parameters applied in the process are listed in Table I. Table II contains fragmentation parameters of the test compounds obtained by GC-EI-MS-MS.

The calibration curves were generated by analyzing blood (urine) samples enriched with respectively 0.032, 0.065, 0.162, 0.325 and 0.650 mg/l (0.065, 0.130, 0.260, 0.520 and 1.040 mg/l) of sodium azide. Every calibration sample was also enriched with tetraphenylethylene (internal standard) in the amount

Tabela I. Zastosowane parametry chromatografu gazowego i spektrometru mas
Table I. Gas chromatograph and mass spectrometer parameters applied in the study

Sprzęt analityczny Analytical equipment	Parametr Parameter	Wartość/Opis Value/Specification
Chromatograf gazowy Gas chromatograph	objętość nastrzyku injection volume	2 µl
	temperatura portu nastrzykowego inlet temperature	250°C
	niepolarna kolumna chromatograficzna non-polar chromatographic column	J&W-UI (15 m × 250 µm × 250 nm, Agilent, USA)
	program temperaturowy temperature programme	40°C (1 min), 30°C/min do 90°C, 10°C/min do 130°C, 40°C/min do 325°C 40°C (1 min), 30°C/min to 90°C, 10°C/min to 130°C, 40°C/min to 325°C
	przepływ gazu nośnego (hel) flow of carrier gas (helium)	1 ml/min
	temperatura linii transferowej transfer line temperature	280°C
Spektrometr mas Mass spectrometer	jonizacja elektronowa electron ionization	70 V
	temperatura źródła jonów ion source temperature	230°C
	temperatura kwadrupoli quadrupole temperature	100°C
	przepływ gazu obmywającego (hel) flow of quench gas (helium)	2,25 ml/min 2.25 ml/min
	przepływ gazu kolizyjnego (azot) flow of collision gas (nitrogen)	1,5 ml/min 1.5 ml/min

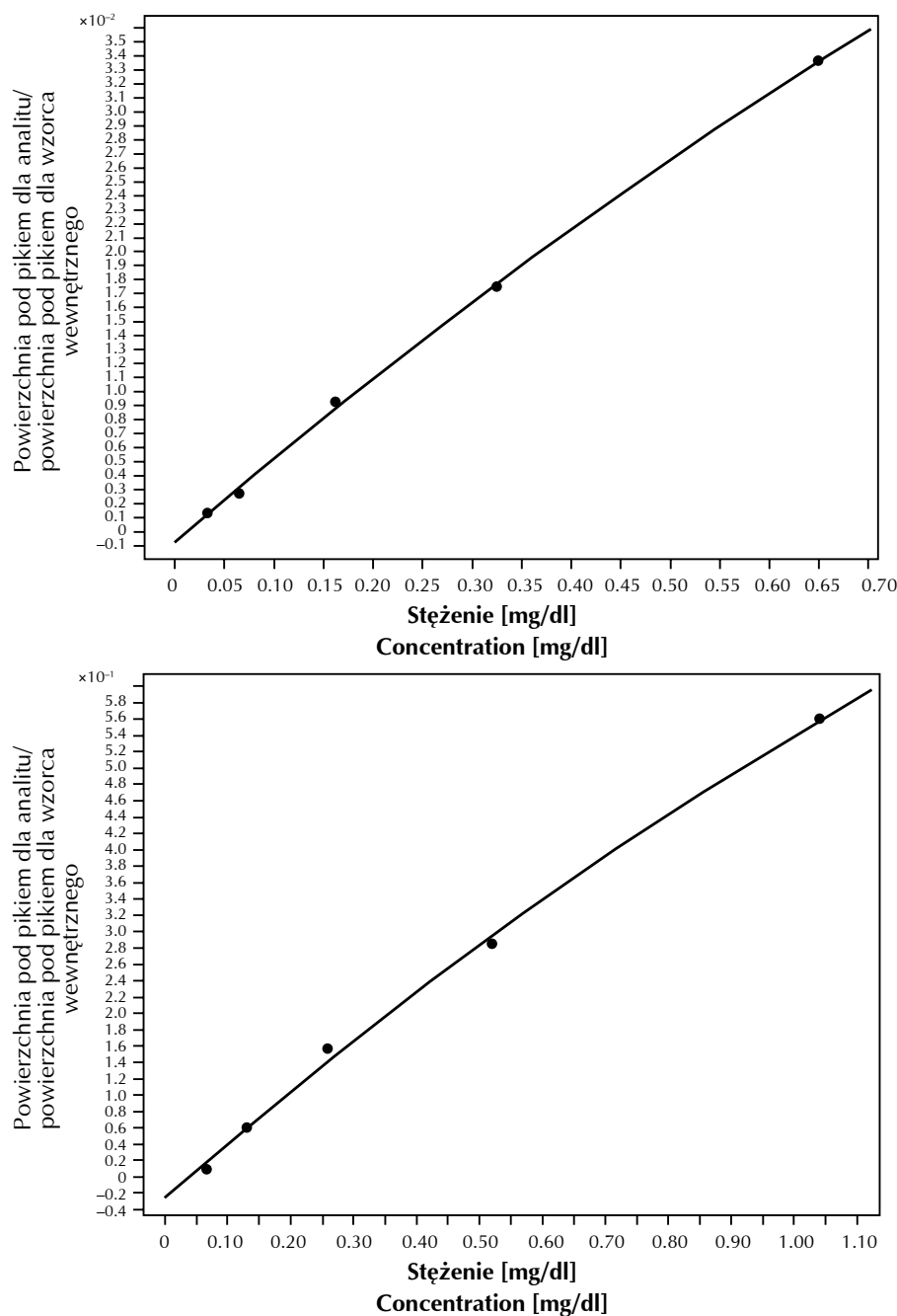
Tabela II. Parametry fragmentacyjne analizowanych związków
Table II. Fragmentation parameters of the analyzed compounds

Nazwa związku Compound name	Jon macierzysty Precursor ion <i>m/z</i>	Jon potomny Product ion <i>m/z</i>	Czas skanowania Dwell time [ms]	Energia dysocjacji zderzeniowej Collision energy [V]
PFBN ₃	223	194	40	5
	194	174	40	15
	194	124	40	20
tetrafenyloetylen tetraphenylethylene	332	253	50	20
	332	241	50	10

Pogrubioną czcionką wyróżniono transmisje *m/z* dla analitu i wzorca wewnętrznego wykorzystane do analizy ilościowej.
The *m/z* transitions for the analyte and the internal standard used for the quantitative analysis are marked in bold.

miały przebieg funkcji potęgowych o równaniach:
 $y = -1,22 \cdot 10^{-8}x^2 + 6,08 \cdot 10^{-5}x - 7,53 \cdot 10^{-4}$ ($R^2 = 0,9993$)
dla krwi oraz $y = -1,08 \cdot 10^{-7}x^2 + 6,74 \cdot 10^{-4}x - 0,02$
($R^2 = 0,9979$) dla moczu (*y* – stosunek sygnału ana-

of 0.100 mg/l for blood and 0.500 mg/l for urine. The calibration curves thus obtained (Fig. 2) were in the form of power functions described by the equations:
 $y = -1.22 \cdot 10^{-8}x^2 + 6.08 \cdot 10^{-5}x - 7.53 \cdot 10^{-4}$ ($R^2 = 0,9993$)



Ryc. 2. Krzywe kalibracyjne dla azydku pentafluorobenzylowego w próbkach krwi (u góry) i moczu (na dole). Zakresy robocze stężeń dla próbek krwi i moczu wyniosły odpowiednio 0,032–0,650 mg/l i 0,065–1,040 mg/l
Fig. 2. Calibration curves for pentafluorobenzyl azide in blood (at the top) and urine (bottom) samples. The working concentration ranges for blood and urine samples were 0.032–0.650 mg/l and 0.065–1.040 mg/l, respectively

litycznego uzyskanego dla PFBN₃ i tetrafenyloetylen; x – stężenie PFBN₃). W przypadku gdy stężenie PFBN₃ przekraczało zakres kalibracji metody (> 1,040 mg/l), mocz badany (200 μ l) rozcieńczyano 10-krotnie moczem wolnym od ksenobiotyków

for blood, and $y = -1.08 \cdot 10^{-7}x^2 + 6.74 \cdot 10^{-4}x - 0.02$ ($R^2 = 0.9979$) for urine (y – ratio of the analytical signal obtained for PFBN₃ and tetraphenylethylene; x – PFBN₃ concentration). Whenever the concentration of PFBN₃ exceeded the calibration range of the

Tabela III. Wyniki badań toksykologicznych próbek krwi i moczu pobranych od zmarłej oraz dane z piśmiennictwa dla przypadków zatruc azydkiem sodu [21]

Table III. Results of toxicological analysis of blood and urine samples collected from the deceased woman and theoretical concentrations of sodium azide in fatal cases [21]

Materiał biologiczny Biological specimen	Stężenie azydku sodu Concentration of sodium azide [mg/l]	Stężenie azydku sodu w przypadkach zatrucia ze skutkiem śmiertelnym Concentration of sodium azide in fatal cases [mg/l]
krew blood	0,18 0.18	2,60–262 2.60–262
mocz urine	6,50 6.50	> 0,14 > 0.14

(1800 µl) i poddawano ekstrakcji zgodnie z powyższym opisem.

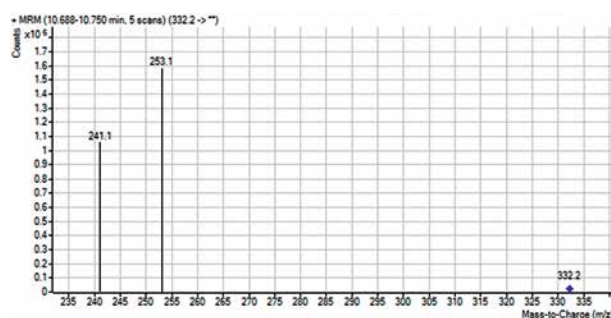
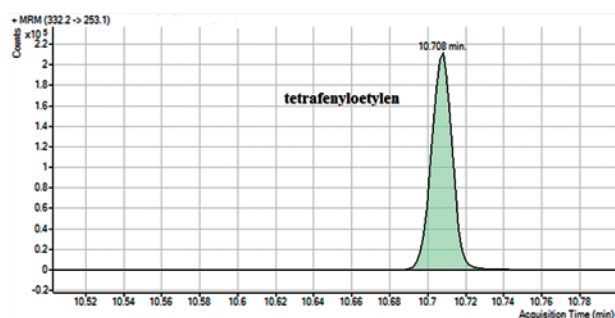
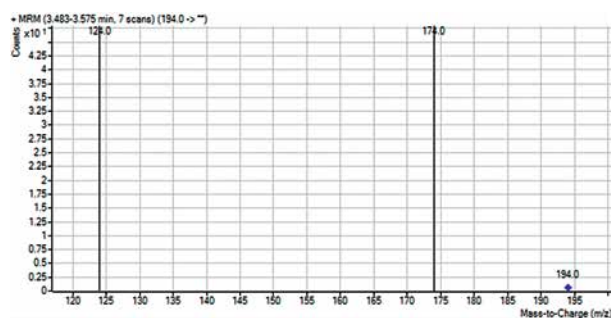
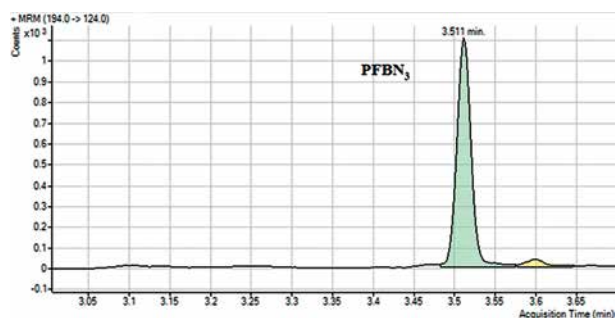
Wyniki

W tabeli III zamieszczono wyniki badań toksykologicznych zmarłej. Tabelę uzupełniono wynikami uzyskanymi z piśmiennictwa dla przypadków zatruc azydkiem sodu [25]. Na rycinach 3. i 4. zamieszczono chromatogramy MRM oraz widma MS/MS dla krwi i moczu zmarłej.

method (> 1.040 mg/l), the urine tested (200 µl) was diluted 10-fold with xenobiotic-free urine (1,800 µl) and then subjected to the extraction procedure in accordance with the description above.

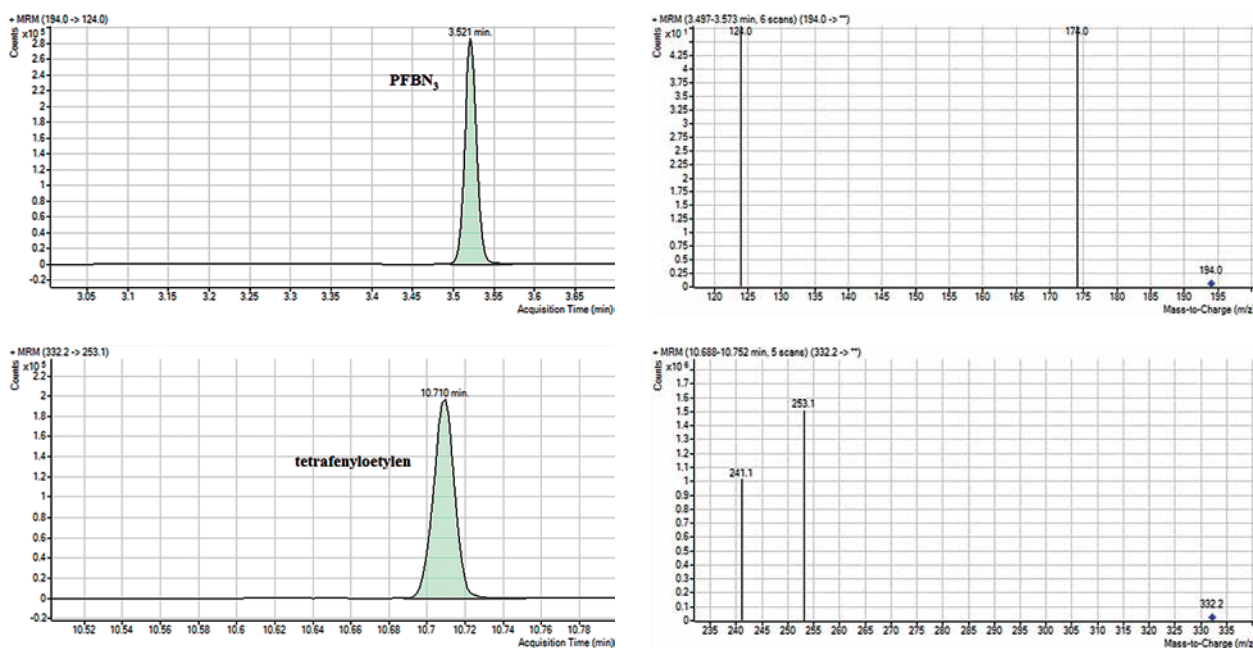
Results

Table III contains results of toxicological tests of the deceased. The Table also lists results derived from the literature for cases of azide sodium poisoning [25]. Figures 3 and 4 show MRM chromatograms and MS/MS spectrum of PFBN₃ and tetraphenylethylene obtained for extracts of the victim's blood sample.



Ryc. 3. Chromatogramy MRM i widma MS/MS dla PFBN₃ i tetrafenyloetyleny uzyskane dla ekstraktów z krwi zmarłej kobiety

Fig. 3. MRM chromatograms and MS/MS spectrum of PFBN₃ and tetraphenylethylene obtained for extracts of the victim's blood sample



Ryc. 4. Chromatogramy MRM i widma MS/MS dla PFBN₃ i tetrafeniloetyleny uzyskane dla ekstraktów z moczu zmarłej kobiety

Fig. 4. MRM chromatograms and MS/MS spectrum of PFBN₃ and tetraphenylethylene obtained for extracts of the victim's blood sample

Dyskusja

W interpretacji wyników toksykologicznych materiału biologicznego pobranego od osoby zatrutej azydkiem sodu kluczowe znaczenie ma toksyczność związku chemicznego oraz jego właściwości fizykochemiczne. Azydek sodu jest stosowany w syntezie organicznej jako czynnik generujący gaz w poduszkach powietrznych, środek napędowy w samolotach odrzutowych, substrat materiałów wybuchowych, herbicyd, insektycyd, nematocyd, fungicyd i bakteriocyd [26]. W przeszłości był też stosowany jako lek obniżający ciśnienie. Azydek sodu jest związkiem bardzo toksycznym zgodnie z klasyfikacją wynikającą z Rozporządzenia (WE) nr 1272/2008 [UE-GHS/CLP] i wykazuje:

- toksyczność ostrą po podaniu doustnym (kategoria 2.),
- toksyczność ostrą dla środowiska wodnego (kategoria 1.),
- przewlekłą toksyczność dla środowiska wodnego (kategoria 1.).

Ponadto, zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE, azydek sodu:

- działa bardzo toksycznie po połknięciu,

grams and MS/MS spectra recorded for blood and urine samples collected from the deceased.

Discussion

The interpretation of toxicological findings obtained for the biological material collected from victims of sodium azide poisoning is crucially dependent on the toxicity of the chemical compound and its physicochemical properties. Sodium azide is used in organic synthesis, as a gas-generating agent in airbags, as a propulsion agent in jet aircraft, as a substrate in explosive materials, herbicide, insecticide, nematocide, fungicide and bactericide [26]. In the past, it was also used as a blood-pressure reducing medication. Sodium azide is highly toxic according to the classification set out in Regulation (EC) No 1272/2008 [UE-GHS/CLP], and exhibits:

- acute oral toxicity (category 2),
- acute aquatic toxicity (category 1),
- chronic aquatic toxicity (category 1).

In addition, as per EU Directives 67/548/EEC or 1999/45/EC, sodium azide:

- is very toxic if swallowed,
- in contact with acids liberates very toxic gases,

- w kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy,
- działa bardzo toksycznie na organizmy wodne,
- może powodować długo utrzymujące się niekorzystne zmiany w środowisku wodnym,
- w kontakcie z metalami tworzy wybuchowe azydki.

Toksyczność ostra narażenia na azydek sodu objawia się poprzez: mdłości, wymioty, ból głowy, obniżenie ciśnienia krwi, częstoskurcz i niedokrwienie mięśnia sercowego oraz kwasicę metaboliczną. W końcowej fazie zatrucia mogą wystąpić bradycardia, konwulsje i zgon [26]. Na podstawie badań toksykometrycznych zaobserwowano także opóźnione objawy narażenia, tj.: działanie drażniące na oczy i układ oddechowy, głębokie obniżenie ciśnienia krwi, demielinizację mielinowanych włókien nerwowych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), uszkodzenie jąder, ślepotę, napady sztywności, działanie toksyczne na wątrobę i mózg.

Mechanizm działania toksycznego nie jest do końca poznany. Uważa się, że przebiega on poprzez hamowanie aktywności oksydazy cytochromowej i katalazy. Zostają także zaburzone procesy fosforylacji (przemiany kwasu adenosynodifosforowego w kwas adenosynotrifosforowy). Azydek sodu ma także działanie rozkurczające na mięśnie gładkie obwodowych naczyń krwionośnych, co prowadzi do obniżenia ciśnienia krwi. Metabolizm przebiega głównie w wątrobie i OUN, następuje również jego przemiana do cyjanoków [13] oraz do tlenu azotu w erytrocytach [27]. Szacuje się, że dawki doustne dla azydku sodu wynoszą 0,7–3,9 mg (dawki terapeutyczne obniżające ciśnienie krwi), 20–180 mg (dawki toksyczne), 700 mg – 20 g (dawki śmiertelne) [26].

Ze względu na dużą specyficzność opracowana metoda GC-EI-MS-MS oznaczania azydku sodu we krwi i moczu wyróżnia się na tle innych metod opisywanych w literaturze przedmiotu [8, 13, 14, 19, 22, 23]. W pracy zrezygnowano z liniowych zależności dla krzywych kalibracyjnych ze względu na lepsze dopasowanie punktów kalibracyjnych do krzywych o przebiegu funkcji potęgowych (ryc. 2.). Interpretując wyniki przeprowadzonych badań toksykologicznych w porównaniu z prezentowanymi wynikami stężeń azydku we krwi przez innych autorów (2,6–262 mg/l; [25]), należy uznać uzyskane stężenie azydku za stosunkowo małe. Co więcej, rozrzut wartości stężeń w publikowanych przypad-

- is very toxic to aquatic life,
- may cause long-term adverse effects in the aquatic environment,
- in contact with metals forms explosive azides.

Acute toxicity following exposure to sodium azide is manifested by nausea, vomiting, headache, reduced blood pressure, tachycardia and cardiac muscle ischaemia, and metabolic acidosis. The final stage of poisoning may be characterized by bradycardia, convulsions and ultimately death [26]. Toxicometric studies have also found delayed symptoms of exposure including eye and respiratory irritation, severe blood pressure decrease, demyelination of myelinated nerve fibres in the central nervous system (CNS), testicular damage, blindness, attacks of rigidity, and hepatic and cerebral effects.

The mechanism underlying the toxic effects of sodium azide is not fully elucidated. It is believed to be based on the inhibition of the activity of cytochrome oxidase and catalase. In addition, it involves disturbance of the processes of phosphorylation (transformation of adenosine diphosphoric acid into adenosine triphosphoric acid). Sodium azide also has a relaxant effect on the smooth muscles of peripheral blood vessels, thus leading to a decrease in blood pressure. Sodium azide is mainly metabolized in the liver and CNS. It is also converted to cyanides [13] and to nitrogen oxide in erythrocytes [27]. It is estimated that oral doses of sodium azide are 0.7–3.9 mg (blood-pressure reducing therapeutic doses), 20–180 mg (toxic doses), 700 mg – 20 g (lethal doses) [26].

Due to its high specificity the GC-EI-MS-MS method of determining sodium azide in blood and urine distinguishes itself from other methods reported in the literature [8, 13, 14, 19, 22, 23]. The study presents no linear equations for calibration curves, as calibration points represent a better fit with curves described by power functions (Fig. 2). An interpretation of toxicological test results in the case reported here in comparison with sodium azide concentrations determined in the blood by other authors (2.6–262 mg/l; [25]) shows that the concentration of sodium azide recorded in the present study is relatively low. Furthermore, the dispersion of concentration values in the published cases of sodium azide poisoning indicates that the problem is complex. This is because that the concentration of sodium azide determined by tests depends not only

kach zatrucia azydkiem sodu nasuwa przypuszczenie o złożoności problemu. Otrzymana wartość stężenia azydku sodu zależy bowiem nie tylko od dawki spożytego ksenobiotyku, lecz także od czasu, jaki upłynął od ekspozycji do zebrania materiału. W opisywanym przypadku czas pomiędzy ekspozycją na azydek sodu a zgonem wynosił ok. 48 godzin, a ksenobiotyk był przyjmowany dwukrotnie w kilkugodzinnym przedziale czasowym.

Dodatkowym elementem tłumaczącym małe stężenie azydku może być ich mała stabilność we krwi sekcyjnej. Kruszyna i wsp. [23] zauważyli, że *in vitro* czas półtrwania azydku w krwi pełnej wynosi 4,5 dnia w temperaturze pokojowej i 12 dni w 0°C. Zaleca się zatem przechowywanie materiału biologicznego w stanie zamrożonym w okresie poprzedzającym procedurę analityczną.

Zatrucia azydkiem sodu zdarzają się stosunkowo rzadko. Jednakże z uwagi na wysoką toksyczność i wszechobecny w życiu współczesnego człowieka dostęp do informacji zarówno klinicyści, jak i biegli sądowi muszą być przygotowani metodycznie na różnorakie i mało prawdopodobne wyzwania. W niniejszym przypadku należy również wspomnieć o psychologicznym aspekcie zdarzenia. Determinacja w podjęciu określonych działań (próba samobójcza) przez osoby zdesperowane wskazuje, że nie istnieją przeszkody odwodzące od osiągnięcia zamierzonego celu.

on the ingested dose of the xenobiotic but also on the time elapsed between the exposure and specimen collection. In the case reported above, the period between exposure to sodium azide and death was approximately 48 hours, and the xenobiotic was ingested twice over an interval of several hours.

An additional factor accounting for the low azide concentration may be the fact that azides have low stability in post-mortem blood. Kruszyna *et al.* [23] have noted that the half-life of azide *in vitro* is 4.5 days at room temperature and 12 days at 0.0°C. Consequently, biological specimens should be stored frozen in the period preceding the analytical procedure.

Sodium azide poisonings are relatively rare. However, since the substance is highly toxic, and access to information in contemporary times is extremely easy, both clinicians and forensic experts must be properly prepared in methodological terms to confront various and relatively unlikely challenges. The case reported above is also important because of the psychological aspect involved in the incident. The determination in undertaking specific actions (a suicidal attempt) by despaired individuals shows unmistakably that no obstacles are able to prevent them from achieving their desired objective.

The authors declare no conflict of interest.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

References

1. Łopaciński B, Kołaciński Z, Winnicka R. Azydek sodu – przebieg kliniczny zatrucia i leczenie. *Przegl Lek* 2007; 64: 4-5.
2. Wiergowski M, Galer-Tatarowicz K, Krzyżanowski M, Jankowski Z, Sein Anand J. Suicidal intoxication with sodium azide – a case report. *Przegl Lek* 2012; 69: 568-571.
3. Meatherall R, Oleschuk C. Suicidal fatality from azide ingestion. *J Forensic Sci* 2015; 60: 1666-1667.
4. Meatherall R, Palatnick W. Convenient headspace gas chromatographic determination of azide in blood and plasma. *J Anal Toxicol* 2009; 33: 525-531.
5. Mutz S, Meatherall R, Palatnick W. Fatal intentional sodium azide poisoning. *Clin Tox* 2009; 47: 713.
6. Kikuchi M, Sato M, Ito T, Honda M. Application of a new analytical method using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the azide ion to human blood and urine samples of an actual case. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 752: 149-157.
7. Edmonds OP, Bourne MS. Sodium azide poisoning in five laboratory technicians. *Br J Ind Med* 1982; 39: 308-309.
8. Reinhardt CF, Brittelli MR. Heterocyclic and miscellaneous nitrogen compounds: Azides. *Patty's industrial hygiene and toxicology* 1981; 2: 2778-2784.
9. Senecal PE, Dyer JE, Osterloh JD, Olson KR. Toxic volatile hydrazoic acid (HN₃) from contact of sodium azide (NaN₃) with acids. *Vet Hum Toxicol* 1991; 33: 364.
10. Albertson TE, Reed S, Siefkin A. A case of fatal sodium azide ingestion. *J Toxicol Clin Toxicol* 1986; 24: 339-351.



11. Howard JD, Skogerboe KJ, Case GA, Raisys VA, Lacsina EQ. Death following accidental sodium azide ingestion. *J Forensic Sci* 1990; 35: 193-196.
12. Klug E, Schneider V. Suicide with sodium azide. *Z Rechtsmed* 1987; 98: 129-132.
13. Lambert WE, Piette M, Van Peteghem C, De Leenheer AP. Application of high-performance liquid chromatography to a fatality involving azide. *J Anal Toxicol* 1995; 19: 261-264.
14. Marquet P, Clément S, Lotfi H, Dreyfuss MF, Debord J, Dumont D, Lachâtre G. Analytical findings in a suicide involving sodium azide. *J Anal Toxicol* 1996; 20: 134-138.
15. Abrams J, El-Mallakh RS, Meyer R. Suicidal sodium azide ingestion. *Ann Emerg Med* 1987; 16: 1378-1380.
16. Emmett EA, Ricking JA. Fatal self-administration of sodium azide. *Ann Intern Med* 1975; 83: 224-226.
17. Judge K, Ward WNE. Fatal azide-induced cardiomyopathy presenting as acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1989; 64: 830-831.
18. Klein-Schwartz W, Gorman RL, Oderda GM, Massaro BP, Kurt TL, Garriott JC. Three fatal sodium azide poisonings. *Med Toxicol Adverse Drug Exp* 1989; 4: 219-227.
19. Groszek B, Kłys M, Pach J. Ostre zatrucie azydkiem sodu drogą doustną. *Arch Med Sąd Krym* 1991; 41: 271.
20. Gussow L. The case of the contaminated coffee pot. *Emergency Medicine News* 2010; 32: 8.
21. Schwarz ES, Wax PM, Kleinschmidt KC, Sharma K, Chung WM, Cantu G, Spargo E, Todd E. Multiple poisonings with sodium azide at a local restaurant. *J Emerg Med* 2014; 46: 491-494.
22. Swarin SJ, Waldo RA. Liquid chromatographic determination of azide as the 3,5-dinitrobenzoyl derivative. *J Liq chromatogr* 1982; 5: 597-604.
23. Kruszyna R, Smith RP, Kruszyna H. Determining sodium azide concentration in blood by ion chromatography. *J Forensic Sci* 1998; 43: 200-202.
24. Kage S, Kudo K, Ikeda N. Determination of azide in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 429-432.
25. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Fourth edition, Pharmaceutical Press, London 2011; 938-939.
26. Baselt RC. *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. Tenth Edition, Chemical Toxicology Institute, Foster City, California 2014; 187-8.
27. Kruszyna H, Kruszyna R, Smith RP, Wilcox DE. Red blood cells generate nitric oxide from directly acting, nitrogenous vasodilators. *Toxicol Appl pharm* 1987; 91: 429-438.

Adres do korespondencji

Karol Kula
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Grzegorzewska 16
31-531 Kraków, Polska
e-mail: karol.kula@uj.edu.p

Address for correspondence

Karol Kula
Chair and Department of Forensic Medicine
Jagiellonian University Medical College
Grzegorzewska 16
31-531 Krakow, Poland
e-mail: karol.kula@uj.edu.pl